

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 12 月 27 日 (27.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/98465 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/10, 15/12, A01K 67/027, A61K 31/711, 38/00, 45/00, 48/00, A61P 35/00, C07K 14/47, G01N 33/15, 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05314
- (22) 国際出願日: 2001 年 6 月 21 日 (21.06.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-191095 2000 年 6 月 21 日 (21.06.2000) JP  
特願 2000-378070  
2000 年 12 月 12 日 (12.12.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 池田恭治 (IKEDA, Kyoji) [JP/JP]; 〒458-0014 愛知県名古屋市中区神沢1-3007 Aichi (JP).
- (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 本山 昇 (MO-TOYAMA, Noboru) [JP/JP]; 〒458-0015 愛知県名古屋市緑区篠の風3丁目252番地 7-106 Aichi (JP). 高井裕之 (TAKAI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒474-0022 愛知県大府市若草町4-37 第二永田マンション2E Aichi (JP). 渡部美穂 (WATANABE, Miho) [JP/JP]; 〒412-0038 静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

[続葉有]

(54) Title: Cds1 GENE-KNOCKOUT CELLS AND MOUSE AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: Cds1遺伝子がノックアウトされた細胞およびマウス、並びにそれらの利用

(57) Abstract: ES cells having been inactivated in one of the loci are established by using the gene targeting method. Then a chimeric mouse is constructed by using the above cells and a genetically modified mouse having been inactivated in both of the Cds1(Chk2) gene pair is thus constructed. The ES cells having been inactivated in one of the gene pair are incubated in a selection medium at a higher concentration to give a mouse ES cell line having been inactivated in the other one of the gene pair too. This mouse or the cells established from this mouse are usable in screening a compound which controls the cell cycle.

(57) 要約:

ジーンターゲティングを用い片方の遺伝子座を不活性化した ES 細胞を樹立し、その細胞を用いてキメラマウスを作成し Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の双方が不活性がされた遺伝子改変マウスを作成した。また、一方の遺伝子対が不活性化された ES 細胞をさらに高濃度の選択培地で培養することにより、遺伝子対のもう一方も不活性化されたマウス ES 細胞株を作成した。該マウスあるいは該マウスから樹立した細胞は、細胞周期を調節する化合物のスクリーニングに利用し得る。



WO 01/98465 A1



(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- 1 -

## 明細書

Cds1 遺伝子がノックアウトされた細胞およびマウス、並びにそれらの利用

技術分野

本発明は、Cds1 遺伝子がノックアウトされた細胞およびマウス、並びにそれらの利用に関する。

背景技術

化学療法剤の中で、三大疾病の一つである癌に対する抗癌剤の開発は社会的に非常に重要である。これまで多くの種類の抗癌剤が開発され、臨床で使用されている。しかしながら、有効性や副作用の点で満足できるものではなく、より癌細胞選択的で副作用が少なく、効果の点でも優れた抗癌剤の開発が望まれている。これまでに、アルキル化剤や白金錯体系抗癌剤に代表される DNA 傷害型抗癌剤が開発されてきた。

一般に、細胞は DNA 傷害が起こった場合、細胞周期を停止して細胞分裂を行わないことにより傷害 DNA の蓄積を防ぎ、自己の生存を高める機構、すなわち細胞周期のチェックポイントを有している (Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. : Science, 246, 629-634, 1989)。DNA に傷害を持つ細胞は、細胞周期のチェックポイントで細胞分裂が停止している間に DNA の修復を行うことで DNA を正常化した後、再度細胞増殖が開始されることになる。一方、細胞周期のチェックポイントで細胞分裂が停止できない場合、DNA に傷害を有する細胞がそのまま細胞増殖を行い、結果としてアポトーシスにより死滅することになる。このような機構により、DNA に損傷を持たない細胞のみが増殖すると考えられている。

細胞周期チェックポイントの機構は正常細胞であっても癌細胞であっても同じである。従って、DNA 損傷を誘導する薬剤、あるいは放射線を作用させることで

- 2 -

癌細胞の DNA に損傷を与えても、細胞周期チェックポイントが働く結果、抗癌剤や放射線で与えた DNA 損傷を修復され、癌細胞は増殖することが明らかになってきた。逆にいえば、癌細胞の細胞周期チェックポイントのみを阻害できれば、抗癌剤や放射線によってもたらされた DNA 損傷が修復されることなく癌細胞の細胞分裂が進み、結果としてアポトーシスが誘導されて癌細胞のみが選択的に死滅すると考えられている。

これまでに、細胞周期チェックポイントとしては、G1/S 期チェックポイント及び G2/M 期チェックポイントが想定されており、G1/S 期チェックポイントで重要な役割を有する物質としては、癌抑制遺伝子産物である p53 が明らかになっている (Kuerbitz, S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 7491-7495, 1992; Hartwell, L.H. et al.: Science, 266, 1821-1825, 1994)。一方、p53 を欠失した癌細胞においても何らかの機構により DNA 傷害に反応して細胞周期を停止し、効率的に障害 DNA を修復できることが明らかとなり (Deng, C. et al.: Cell, 82, 675, 1995; Waldman, T. et al.: Cancer Res., 55, 5187, 1995; Brown, J.P. et al.: Science, 277, 831, 1997; Powel, S.N. et al.: Cancer Res, 55, 1643, 1995)、p53 が関与する G1/S 期チェックポイントとは異なる、G2/M 期チェックポイントの存在が明らかになった。そして、G2/M 期チェックポイントで重要な役割を果たす物質として、Cds1 (Chk2) が既に同定されている (Matsuoka, S. et al.: Science, 282, 1893, 1998)。

p53 欠損癌細胞あるいは p53 変異癌細胞は臨床的にも肺癌、大腸癌、膵癌等の存在が認められており、これら p53 欠損癌細胞あるいは p53 変異癌細胞では、Cds1 (Chk2) に作用し、この p53 非依存的な DNA 傷害チェックポイント機構である G2/M 期チェックポイントを阻害できれば、癌細胞のみを特異的に死に至らしめることができると推測される。Cds1 (Chk2) は細胞周期の G2/M 期チェックポイントに関与するだけでなく、p53 の安定化を介して細胞周期停止や修復、アポト

- 3 -

ーシスにも関係していることが最近明らかにされている (Hirao, A. et al.: Science, 287, 1824, 2000)。

しかしながら、Cds1(Chk2)の作用に関しては未だ明らかになっておらず、Cds1(Chk2)を抑制した場合に本当に癌細胞特異的な細胞死を誘導することができるのか、あるいは予想される副作用はどのようなものであるかを検討できる実験系が求められている。これまでに、Cds1(Chk2)遺伝子対が不活性化された ES 細胞と胸腺細胞は知られている (Hirao, A. et al.: Science, 287, 1824, 2000) が、個体レベルでの解析は不可能であった。

Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の双方が不活性化され、Cds1(Chk2)の酵素活性を全く持たない遺伝子改変マウス、遺伝子改変マウスから樹立された細胞株 (遺伝子マウス由来細胞株)、ES 細胞株があれば、種々に分化した細胞における Cds1(Chk2)の個体レベルおよび細胞レベルでの生理機能の解明、チェックポイントを欠損するモデルとして抗癌剤の作用点の解析、チェックポイント阻害効果を有する新規薬剤探索、チェックポイント阻害効果を有する新規薬剤の個体レベルの効果判定などに利用することができ、新規の抗癌剤の開発のための重要な情報が得られる点で有用である。

#### 発明の開示

本発明は、Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の一方または双方が不活性化され、新規の抗癌剤の開発などに有用である遺伝子改変マウス、および該遺伝子改変マウスから樹立された細胞株及び遺伝子改変 ES 細胞株、並びにそれらの用途を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、ジーンターゲティングを用い片方の遺伝子座を不活性化した ES 細胞を樹立し、その細胞を用いてキメラマウスを作成し Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の双方が不活性がされた遺伝子改変マウスを作成した。また、一方の遺伝子対が不活性化された ES 細

- 4 -

胞をさらに高濃度の選択培地で培養することにより、遺伝子対のもう一方も不活性化されたマウス ES 細胞株を作成し本発明を完成した。即ち、本発明は、Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子が挿入されていることを特徴とする遺伝子改変マウス及びマウス ES 細胞株、及び当該遺伝子改変マウスから樹立された細胞株、並びにそれらの利用を提供するものである。

本発明の遺伝子改変マウス及びマウス ES 細胞株は、以下のようにして作成することができる。まず、マウスから Cds1(Chk2)遺伝子のエクソン部分を含む DNA を単離し、この DNA 断片に適当なマーカー遺伝子を挿入し、ターゲッティングベクターを構築する。このターゲッティングベクターをエレクトロポレーション法などによりマウス ES 細胞株に導入し、相同組み換えを生じた細胞株を選抜する。挿入するマーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子が好ましい。抗生物質耐性遺伝子を挿入した場合には、抗生物質を含む培地で培養するだけで相同組み換えを生じた細胞株を選抜することができる。また、より効率的な選抜を行うためにはターゲッティングベクターにチミジンキナーゼ遺伝子などを結合させておくのが好ましい。これにより、非相同組み換えを起こした細胞株を排除することができる。また、ターゲッティングベクターにジフテリアトキシン A フラグメント(DT-A)遺伝子などを結合させておくこともできる。これにより、相同的な組換えを起こした細胞株を排除することができる。

上記操作により、Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の一方が不活性化された細胞株を得ることができる。得られた ES 細胞株をマウス胚盤葉にインジェクションしキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスを交配させることで、Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の一方を不活性化したマウスを得ることができる。このマウスを交配させることで、Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したマウスを得ることができる。また、Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化した ES 細胞株は、本実施例に記載の方法により取得することができる。すなわち、遺伝子対の一方を不活性化した ES 細胞株を高濃度の抗生物質を含む培地

で培養することにより、遺伝子対のもう一方も不活性化された細胞株、即ち Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化した ES 細胞株を得ることができる。また、遺伝子対の一方を不活性化した ES 細胞株を選抜し、この細胞株に再度ターゲティングベクターを導入し、相同組換えを生じた細胞株を選択することでも作製することができる。ターゲティングベクターに挿入するマーカー遺伝子は、前出のマーカー遺伝子とは異なるものを使用することが好ましい。

本発明の遺伝子改変マウス由来の細胞株を樹立する方法としては、公知の方法を用いることができる。例えばげっ歯類胎仔細胞の初代培養の方法を用いることができる（新生化学実験講座、18 巻、125 頁～129 頁東京化学同人、及びマウス胚の操作マニュアル、262 頁～264 頁、近代出版）。

本発明の遺伝子改変マウス、該マウスから樹立した細胞株、及びマウス ES 細胞株は、例えば、DNA を標的とする抗癌剤の作用・副作用の感度の高い検出系、細胞周期停止・アポトーシス機序の解析系または DNA 修復機序の解析系などに利用することができる。

例えば、本発明の遺伝子改変マウス及びマウス ES 細胞株は、Cds1(Chk2)阻害剤の副作用を推測する為に使用することができる。本発明で得られた遺伝子改変マウスは正常に生育し、少なくとも胎児期に死亡することはなかったことから、Cds1(Chk2)阻害剤は致死性の副作用はないことが明らかになった。さらに、遺伝子改変マウスを詳細に検討することで Cds1(Chk2)阻害剤の副作用を推測することが可能になる。また、遺伝子改変マウスの組織から樹立した細胞株を用いることで、各組織での Cds1(Chk2)阻害剤の副作用を詳細に検討することが可能になる。

また、本発明の遺伝子改変マウスの症状を観察し、これまで原因の明らかでなかった疾患の症状と比較することで、疾患の原因が Cds1(Chk2)の機能不全であることを明らかにすることができる。例えば、遺伝子改変マウスあるいは当該マウス由来細胞株に特徴的に現れる表現型を観察する。ついで、ヒトの疾患の諸症

- 6 -

状と比較する。当該ヒトの疾患の諸症状のうち半分以上が本発明の遺伝子改変マウスで観察されれば、当該疾患の原因が Cds1(Chk2)の機能不全であると推定することができる。

本発明の遺伝子改変マウス及びマウス ES 細胞株及び該遺伝子改変マウス由来の細胞株は、Cds1 が不活化されているため、G2/M 期チェックポイントに関わるシグナル伝達機構および細胞周期の維持機構を欠損している。このため DNA 損傷が起きた後に、G2/M 期チェックポイントで DNA を維持・修復する能力が阻害されている。即ち、当該遺伝子改変マウス及びマウス ES 細胞株及び当該遺伝子改変マウス由来の細胞株では、DNA 修復が可能なチェックポイントは G1/S 期チェックポイントのみである。従って、該マウスや細胞を用いれば、G1/S 期チェックポイントに係わる抗癌剤を高感度で効率よくスクリーニングすることができる。

DNA を標的とする抗癌剤の作用・副作用の感度の高い検出系の例としては、X 線照射あるいは DNA 傷害性抗癌剤・試薬（シスプラチン、アドリアマイシン、メチルメタンスルホン酸など）、トポイソメラーゼ阻害剤（カンプトテシン、ビンデカンなど）、代謝拮抗剤（フッ化ピリミジン誘導体など）などの DNA を標的とする抗癌剤が知られている。本発明のスクリーニングにおいて、これら抗癌剤の添加または X 線照射に加えて、被検化合物を本発明のマウス ES 細胞株あるいは遺伝子改変マウス由来の細胞株の培養液に添加して培養し、遺伝子改変されていないマウスや細胞と比較して、増殖抑制効果が認められれば、当該抗癌剤や化合物は G1/S 期チェックポイントに阻害していることを確定することができ、G1/S 期チェックポイントに特異的に阻害する薬剤を同定することができる。

さらに、本発明の遺伝子改変マウスに発癌性物質、例えば 1,2-ジメチルヒドラジン、3-メチルコラントレン、ジメチルベンズアントラセンなど、を投与し、腫瘍化した細胞を用いて同様の方法により、G1/S 期チェックポイントに特異的に阻害する薬剤を同定することができる。



- 7 -

本発明の細胞株や遺伝子改変マウスは、細胞周期停止・アポトーシス機序の解析にも用いることができる。X線やDNA傷害性試薬などによりDNA損傷を与えて細胞周期の停止やアポトーシスを誘導し、本発明の細胞株や遺伝子マウスと正常細胞の反応の違いを比較すればよい。

また、本発明の細胞株や遺伝子改変マウスは、被検蛋白質がCds1(Chk2)の機能を代替する機能を有するか否かの判定やCds1(Chk2)の機能を代替するタンパク質の同定に利用することも可能である。さらに、Cds1(Chk2)の機能を代替する機能を有するタンパク質をコードするDNAのスクリーニングに利用することも可能である。

例えば、新規遺伝子や新規蛋白質を本発明の細胞株に導入し、G1/S期チェックポイントに阻害する薬剤を作用させ、G2停止（アレスト）が惹起されれば、導入した遺伝子やタンパク質がCds1(Chk2)の機能を代替することを確認することができる。従って、新規なCds1(Chk2)機能代替遺伝子あるいはタンパク質の同定に利用することができる。DNAライブラリーを細胞株に導入して、同様に実験を行えば、新規なCds1(Chk2)機能代替遺伝子あるいはタンパク質をスクリーニングすることもできる。この様にして同定・単離される新規なCds1(Chk2)機能代替遺伝子あるいはタンパク質は、Cds1(Chk2)の機能不全によって生じている疾患の治療に用いることができる。

また、本発明のES細胞株及び当該遺伝子改変マウス由来の細胞株は、G2/M期チェックポイントを促進する化合物のスクリーニングにも利用することができる。当該細胞はG2/M期チェックポイントを欠損するためG2停止の時間が短くなっている。従って、X線処理あるいはDNA傷害性試薬で処理した当該細胞に被検物質を接触させ、その後細胞が、遺伝子改変しない細胞と同程度にG2停止を維持できるか否かを指標にスクリーニングを行えば、G2/M期チェックポイントを促進する薬剤を同定することができる。G2停止の検出方法としては、プロビジウムイオダイド等によるDNA染色をFACSにて測定すればよい。

本発明の細胞株や遺伝子マウスは、DNA 修復機序の解析にも使用できる。本発明の細胞株やマウスに対して X 線や DNA 傷害性試薬などを与えた後、切断された DNA 修復活性を測定する (Tanaka, H., et al.: Nature 404, 42-49 (2000)、または新生化学実験講座、2 巻、139 頁～200 頁)。正常細胞に同様の操作を行い、DNA 修復活性の低下あるいは上昇が認められれば、Cds1(Chk2)が DNA 修復活性に関与していることを確認することができる。DNA 修復活性が上昇していれば、特異的に産生されている mRNA を同定することで、DNA 修復活性を有する新規タンパク質を同定することができる。DNA 修復活性が低下していれば、DNA 修復活性を誘導する化合物あるいは DNA 修復活性を有する新規タンパク質をコードする遺伝子のスクリーニングに使用することができる。例えば、対照として、本発明の細胞に X 線を照射する、あるいは DNA 損傷を誘導する薬物と一緒に培養し、DNA 修復活性を測定する。一方、被検物質と共培養した、あるいは DNA ライブラリーをもちいて遺伝子を細胞に導入して培養した細胞の DNA 修復活性を測定し、当該細胞で DNA 修復活性が上昇していれば、被検物質が DNA 修復活性を誘導する化合物である、あるいは、導入された遺伝子が DNA 修復活性を有する新規タンパク質をコードする遺伝子であることがわかる。

また、本発明のマウス及びマウス ES 細胞株及びマウス由来の細胞株を細胞周期・アポトーシス・チェックポイントなどに関わる他のノックアウトマウスと交配し双方の遺伝子がともに欠損したマウスや細胞を得られれば、薬剤評価系の作製への利用や抗癌剤などの薬剤標的分子の同定などにより効果的に利用することができる。

本発明のスクリーニングにより単離しうる化合物をヒトや他の動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプ

セル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50 と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例え

- 10 -

ばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 0.1 から 100mg、好ましくは約 1.0 から 50mg、より好ましくは約 1.0 から 20mg であると考えられる。

非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg として）においては、通常、1 日当り約 0.01 から 30mg、好ましくは約 0.1 から 20mg、より好ましくは約 0.1 から 10mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重 60kg 当りに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、Cds1<sup>-/-</sup>ES 細胞に放射線を照射した後の p53 蛋白質量の経時的変化をウェスタンブロッティングにて解析した結果を示す写真である。Cds1<sup>-/-</sup>ES 細胞においても野生型と同様 60 分以降に p53 の発現誘導が見られたが、発現量は減少していた。さらに、Cds1<sup>-/-</sup>ES 細胞における p53 発現誘導は野生型と同様カフェインにより阻害された。

- 1 1 -

図 2 は、放射線照射後の Cds1 (Chk2)+/-または-/-ES 細胞の細胞周期分布を解析した結果を示す図である。各 ES 細胞に X 線を照射した後、プロモデオキシウリジン (Br-dU) で DNA を標識し、FACS にて細胞周期の分布を解析した。また、放射線照射後にカフェインを添加した場合の変化を比較した。放射線非照射の場合は Chk2+/-および Chk2-/-ES 細胞間で細胞周期の分布に違いは認められなかった。また放射線照射・非照射後、およびカフェイン添加・非添加後で 6 時間後の細胞周期分布に顕著な差は認められなかった。

図 3 は、Cds1 (Chk2) 遺伝子座の構造および Cds1 (Chk2) 遺伝子座に変異遺伝子を挿入するための相同組換え用ベクターの構造を示した図である。相同組換えによりマウス Cds1 (Chk2) 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 5 をネオマイシン耐性遺伝子発現カセットと置換するよう、ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットの両端にエクソン 1 を含む遺伝子断片およびエクソン 6 を含む遺伝子断片を結合することで相同領域を配し、さらに 3' 下流側に tk 発現カセットを結合し、相同組換えベクターを作製した。

図 4 は、Cds1 (Chk2) 遺伝子対の一方あるいは双方が不活性化された ES 細胞の遺伝子型解析および Cds1 (Chk2) 遺伝子発現解析の結果を示した写真である。正常の Cds1 (Chk2) 遺伝子座は 7.2kb 長の断片を示し、相同組換えにより変異 Cds1 (Chk2) 遺伝子が挿入された遺伝子座は 2.8kb 長の断片を示す (左図)。Cds1 (Chk2) 遺伝子対の一方に変異 Cds1 (Chk2) 遺伝子が挿入された NEA39 株を 3mg/ml の G418 で選択することにより、もう一方の遺伝子対にも変異 Cds1 (Chk2) 遺伝子が挿入された NEA39-3 を得た。NEA39 株が Cds1 (Chk2) mRNA の発現を示すのに対し、この NEA39-3 株では Cds1 (Chk2) mRNA の発現は認められなかった (右図)。

図 5 は、Chk2-/-および p53-/-胸腺細胞の放射線感受性を示した図である。Chk2-/-マウスおよび p53-/-マウスより胸腺細胞を調製したのち、CD4 と CD8 抗体で二重染色しセルソーターにて分布を解析した (左図)。CD4 陽性または CD8 陽性細胞は、Chk2-/-胸腺細胞は Chk2+/+細胞と同じ分布を示した。各胸腺細胞に 1

- 12 -

0Gy の X 線を照射した後 24 時間および 48 時間後の細胞の生存率を測定した（右図）。その結果、X 線により誘導される胸腺細胞のアポトーシスは、野生型に比較して低下していたが、p53<sup>-/-</sup>細胞ほどの抵抗性は示さなかった。

図 6 は、Chk2<sup>-/-</sup>および p53<sup>-/-</sup>マウス胚繊維芽細胞の X 線による細胞周期の変化を示した図である。Chk2<sup>-/-</sup>マウスおよび p53<sup>-/-</sup>マウスの胚繊維芽細胞を調製し、10Gy の X 線を照射し 0 時間後および 12 時間後の細胞周期の分布を FACS にて解析した。X 線非照射前後において、Chk2<sup>-/-</sup>マウス胚繊維芽細胞は、野生型と同様の細胞周期分布を示した。一方、p53<sup>-/-</sup>マウス胚繊維芽細胞は、X 線照射後に G1 期停止がより抑制された分布を示した。

図 7 は、Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウス、Cds1(Chk2)<sup>+/-</sup>マウス、野生型マウスに対し放射線照射を行った後の生存率の変化を示した図である。Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスは、Cds1(Chk2)<sup>+/-</sup>マウス、野生型マウスに比べて放射線照射により死亡するマウスの割合が低い。

図 8 は、放射線照射後 3 ヶ月のマウスの外観を示す写真である。Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウス、野生型マウスとも被毛の脱色素が認められるが、Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスでは脱色素の範囲が広範囲に渡っている。境界をわかりやすくするために白線を付加している。

図 9 は、放射線照射後の血液学的検査結果を示すグラフである。白血球数、血小板数はいずれの遺伝子型においても同様の減少が見られた。ヘマトクリット値はいずれの遺伝子型においても放射線照射による変化は見られなかった。

図 10 は、放射線照射後の新生児の小腸におけるアポトーシスを示した組織写真である。Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスではアポトーシスを示す細胞の減少が見られた。

図 11 は、放射線照射後の新生児の胸腺におけるアポトーシスを示した組織写真である。Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスではアポトーシスを示す細胞の減少が見られた。

- 13 -

図12は、放射線照射後の新生児の小脳の顆粒細胞層におけるアポトーシスを示した写真である。Cds1(Chk2)-/-マウスではアポトーシスを示す細胞の減少が見られた。

図13は、Cds1(Chk2)-/-マウス、野生型マウスの胸腺細胞に対し放射線照射によるp53発現の誘導を行い、p53タンパクの発現量を調べた結果を示したものである。Cds1(Chk2)-/-マウスでは野生型マウスに比べてp53タンパク量が少ないことが示された。

図14は、Cds1(Chk2)-/-マウス、野生型マウスの胸腺細胞に対し放射線照射によるp53発現の誘導を行い、p53が発現調節を行うとされる遺伝子発現を調べた結果を示したものである。Cds1(Chk2)-/-マウスでp21、Noxaの発現の減少が見られた。

図15は、Cds1-/-および野生型マウスに対して放射線照射を行った後の胸腺細胞のポピュレーションをFACSにて解析した結果を示したものである。野生型マウスではCD4/CD8ダブルポジティブ細胞の減少がみられ、放射線照射への感受性を示したが、Cds1-/-マウスではCD4/CD8ダブルポジティブ細胞の減少は見られず、p53-/-マウスと同様の放射線照射への感受性の低下すなわち抵抗性が認められた。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### [実施例1] Cds1(Chk2)遺伝子の相同組み換え用ベクターの作製

本実施例では、マウスCds1(Chk2)遺伝子の相同組み換え用ベクターを構築するために、まずマウスCds1(Chk2)ゲノム遺伝子のクローニングを行った。マウス(129/SvJ)肝臓のcDNAライブラリー(Lamda FIXII, Stratagene)を用いて、ヒトCds1 cDNAのオープンリーディングフレームをプローブとして、ブランク

- 14 -

ハイブリダイゼーションを行い、Cds1(Chk2)遺伝子エクソン1を含む約20kbのgenomic DNA断片を単離し、制限酵素部位のマッピングを行った。Cds1(Chk2)遺伝子エクソン6を含む6kb断片の3'下流側にTK発現カセットを結合し、Cds1(Chk2)遺伝子エクソン2から5をネオマイシン耐性遺伝子(Neo<sup>r</sup>)遺伝子発現カセットと置換するような相同組み換え用ベクターを作成した。

〔実施例2〕 相同組換えにより変異Cds1(Chk2)遺伝子が挿入されCds1(Chk2)遺伝子対の一方が不活化されたES細胞の樹立

本実施例では、相同組み換え用ベクターを、エレクトロポレーション法によりマウスES細胞E14 (Hooper, M. et al.: Nature, 326, 292-295, 1987) に導入し、次いでG418、ガンシクロビルにより選択培養を行った。得られたG418/ガンシクロビル耐性コロニーについて、PCRおよびサザンプロットにより相同組み換え体の検定を行い、Cds1(Chk2)遺伝子対の一方に変異Cds1(Chk2)遺伝子が挿入された細胞株を5クローン得た。

〔実施例3〕 相同組換えにより変異Cds1(Chk2)遺伝子が挿入されCds1(Chk2)遺伝子対の双方が不活性化されたES細胞の樹立

相同組換え用ベクターの導入により変異Cds1(Chk2)遺伝子が挿入されCds1(Chk2)遺伝子対の一方が不活化されたES細胞株を高濃度のG418による選別を行うことにより、もう一方の遺伝子対も不活性化された細胞株、即ち本発明のマウスES細胞株を4クローン得た。得られたクローンについて、サザン解析により変異遺伝子の挿入を、またノーザン解析によりCds1遺伝子対の双方が不活性化していることを確認した(図4)。

〔実施例4〕 Cds1(Chk2)遺伝子対の一方が不活性化されたES細胞によるキメラマウスの作製

Cds1(Chk2)遺伝子対の一方が不活化されたES細胞株を、C57BL/6マウス由来の胚盤胞にインジェクションしキメラマウスを得た。

〔実施例5〕 Cds1(Chk2)遺伝子対の双方が不活性化されたマウスの作製



- 15 -

Cds1(Chk2)遺伝子対の一方が不活化された ES 細胞を用いて作製されたキメラマウスを C57BL/6 マウスと交配し、Cds1(Chk2)遺伝子対の一方が不活化された細胞から成るマウス (Cds1(Chk2)+/-マウス) を得た。これらの Cds1(Chk2)+/-マウス同士を交配することにより、Cds1(Chk2)遺伝子対の双方が不活性化されたマウス (Cds1(Chk2)-/-マウス) を得た。

【実施例 6】 Cds1(Chk2)遺伝子対の双方が不活性化された ES 細胞株あるいはマウスにおける Cds1(Chk2)遺伝子発現の解析

Cds1(Chk2)遺伝子対の双方が不活性化された ES 細胞株あるいはマウス (Cds1(Chk2)-/-マウス) は、致死性を示さず、複数のラインのマウス及び細胞株を作成できた。これらいずれにおいても Cds1(Chk2)mRNA の発現は認められなかった。

【実施例 7】 Cds1(Chk2)遺伝子対の一方あるいは双方が不活性化された ES 細胞株を用いた X 線に対する細胞周期停止と p53 分子の安定化に関する検討

Cds1(Chk2)遺伝子対の一方あるいは双方が不活化された ES 細胞株 (Cds1(Chk2)+/-、Cds1(Chk2)-/-) をトリプシンで処理した後、計数し、一定数の ES 細胞をあらかじめフィーダー細胞を播いた 6 穴プレートに植え込んだ。フィーダー細胞としては、MEF(mouse embryonic fibroblast)を使用した。X 線で処理した後、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 6 時間培養し、細胞抽出液を作成し SDS-PAGE にて分離後、PVDF 膜に転写し、抗 p53 抗体でウエスタンブロットを行い p53 タンパクの定量を行った。この結果、図 1 に示すように Cds1(Chk2)+/-細胞では p53 分子が安定化して量が増えているのに対して、Cds1(Chk2)-/-細胞では p53 の安定化が認められなかった。さらに、Cds1-/- ES 細胞における p53 発現誘導は野生型と同様カフェインにより阻害されたことから、Cds1-/-細胞における p53 の安定化は野生型のものと同じ経路に依存していると推定された。また、一方 FACS にて細胞周期を検討した結果、図 2 に示すように Cds1(Chk2)+/-細胞も Cds1(Chk2)-/-細胞も同様に G2 アレストが認められた。

【実施例 8】 Cds1 遺伝子改変マウス由来のマウス胚繊維芽細胞の樹立

- 16 -

交尾後 12.5～14.5 日目のマウス胚を切り出し、頭部と内蔵を取り除いた。胚をハサミで刻みチューブに移した。一匹あたり 2ml のトリプシン/EDTA を加え、4℃でオーバーナイトインキュベートしたのち、一匹あたり 2ml の 10%牛胎児血清添加 DMEM を加えピペットでよく攪拌し、細胞の single cell 懸濁液を調整した。遠心分離により細胞を回収し、10%牛胎児血清、1mM ビルビン酸ナトリウム、2mM グルタミン、50microM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、ペニシリン、ストレプトマイシン、4500mg/L グルコースを含む DMEM 培地にて培養を行った。

〔実施例 9〕 胸腺細胞を用いた解析

Chk2<sup>-/-</sup>マウスおよび p53<sup>-/-</sup>マウスより胸腺を取り出した後、培地中で分散させ胸腺細胞を調製した。胸腺細胞を FITC-CD4 抗体およびローダミン CD8 抗体で二重染色したのち、セルソーターにて分布を解析した。Chk2<sup>-/-</sup>および p53<sup>-/-</sup>胸腺細胞に 10Gy の X 線を照射した後、24 時間および 48 時間後の細胞をアネキシン V およびプロビジウムイオダイドによる二重染色法により測定した。未処理細胞に対する各細胞の生存率を計測した（図 5）。

〔実施例 10〕 セルソーターによる細胞周期の解析

Chk2<sup>-/-</sup>マウスおよび p53<sup>-/-</sup>マウスの胚繊維芽細胞を調製し、各細胞に 10Gy の X 線を照射する直前および X 線照射 12 時間後の細胞を CycleTEST plus(cat No. 340242, Becton Dickinson)をもちいたプロビジウムイオダイド法により染色し、細胞周期の分布をセルソーターにて解析した（図 6）。

〔実施例 11〕 放射線照射に対する Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスの生存性の検討

Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウス、Cds1(Chk2)<sup>+/-</sup>マウス、野生型マウスに対し放射線照射を行い、生存性の検討を行った。この結果、Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスは、Cds1(Chk2)<sup>+/-</sup>マウス、野生型マウスに比べて放射線照射により死亡するマウスの割合が低く、放射線障害に対し抵抗性を示した（図 7）。また、放射線照射後死亡を免れたマウスに被毛の脱色素が認められた（図 8）。

- 17 -

〔実施例 1 2〕 放射線照射に対する Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスの血液学的検査

Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウス、Cds1(Chk2)<sup>+/-</sup>マウス、野生型マウスに対し放射線照射を行い、血液学的検査を行った。いずれの遺伝子型においても放射線照射によるヘマトクリット値の変化は見られなかったが、白血球数、血小板数はいずれの遺伝子型においても顕著な減少が見られた (図 9)。

〔実施例 1 3〕 放射線照射に対する Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスの組織学的検査

Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウス、Cds1(Chk2)<sup>+/-</sup>マウス、野生型マウスに対し放射線照射を行い、脾臓および骨髄の組織学的検査を行った。骨髄ではいずれの遺伝子型においても造血細胞の減少が認められた。Cds1(Chk2)<sup>+/-</sup>マウス、野生型マウスの脾臓においては、リンパ球が消失し濾胞の萎縮が認められたが、Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスの脾臓において濾胞の萎縮は認められなかった。

〔実施例 1 4〕 放射線照射により誘導されるアポトーシスの解析

Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウス、野生型マウスの新生児に対し放射線照射を行い、小腸、胸腺、小脳顆粒細胞層におけるアポトーシスの解析を行った。Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスのこれらの組織ではアポトーシスの減少が見られた (図 10～12)。また、Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>および野生型マウスに対して放射線照射を行った後の胸腺細胞を CD4 抗体と CD8 抗体で二重染色し、FACS にて分布を解析した。その結果、CD4/CD8 ダブルポジティブ細胞は、野生型マウスでは放射線感受性を示したが、Cds1<sup>-/-</sup>マウスでは p53<sup>-/-</sup>マウスと同様の感受性の低下が認められた (図 15)。

。

〔実施例 1 5〕 胸腺細胞における p53 安定化に関する検討

Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウス、野生型マウスの胸腺細胞に対し放射線照射を行い p53 発現を誘導し、p53 タンパクの発現量を調べた結果、Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスに比べて p53 タンパク量が少ないことが示された (図 13)。

〔実施例 1 6〕 胸腺細胞における遺伝子発現の検討

- 18 -

Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウス、野生型マウスの胸腺細胞に対し放射線照射を行い p53 発現を誘導し、p53 が発現調節を行うとされる遺伝子発現を調べた。この結果、Cds1(Chk2)<sup>-/-</sup>マウスでは p21、Noxa の発現の減少が見られた (図 14)。

【実施例 17】 Chk2<sup>-/-</sup>マウスおよび放射線照射した Chk2<sup>-/-</sup>マウスにおける腫瘍形成の観察

Chk2<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>マウスの長期飼育を行い腫瘍形成の有無の観察を行った。生後 6 ヶ月齢の Chk2<sup>-/-</sup>マウスで乳腺腫瘍の形成が観察されたが、同週齢の Chk2<sup>+/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>マウスでの腫瘍形成は観察されなかった。

8Gy の放射線照射を行ったマウスでは、Chk2<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>マウスいずれにおいてもリンパ腫が認められたが、Chk2<sup>+/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>マウスでは生後 6 ヶ月齢で腫瘍が観察されたのに対し、Chk2<sup>-/-</sup>マウスでは 5 ヶ月齢から観察された。

【実施例 18】 放射線照射に対する Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスの生存性の検討

Chk2<sup>+/-</sup>マウスと p53<sup>-/-</sup>マウス (Taconic 社より購入) の交配あるいは体外受精により、Chk2<sup>+/-</sup>・p53<sup>+/-</sup>マウスを得て、Chk2<sup>+/-</sup>・p53<sup>+/-</sup>マウス同士の交配あるいは体外受精により、Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスを得た。これらのマウスに対し、4Gy の放射線照射を行い、生存性の検討を行った。この結果、照射後 28 週目における Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスの生存率が 6%であるのに対し、Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスの生存率は 20%であった。Chk2 遺伝子が欠損することにより Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスの死亡を抑制できることが示された。

【実施例 19】 放射線照射に対する Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスの血液学的検査

Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>+/+</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>+/+</sup>マウスに対し、8Gy の放射線照射を行い、血液学的検査を行った。いずれの遺伝子型においても放射線照射によるヘマトクリット値の変化は見ら

れなかったが、白血球数、血小板数はいずれの遺伝子型においても顕著な減少が見られた。

〔実施例 20〕 放射線照射に対する Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスの脾臓の組織学的検査

Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>+/+</sup>マウスに対し 8Gy の放射線照射を行い、脾臓の組織学的検査を行った。Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>+/+</sup>マウスでは B-cell zone、T-cell zone において顕著な萎縮が見られたが、Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスでは萎縮はあまり見られなかった。Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>+/+</sup>マウス、Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスでは胚中心はほとんど見られなかったが、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスではやや不明瞭ではあるが胚中心の形成が見られた。萎縮の抑制は p53 遺伝子の欠損に依存しており Chk2 遺伝子の欠損による影響は見られなかった。胚中心への障害は p53 遺伝子の欠損に依存して抑制されるが、Chk2 遺伝子欠損によりその抑制が解除されることが示された。

〔実施例 21〕 放射線照射に対する Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスの胸腺の組織学的検査

Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>+/+</sup>マウスに対し 8Gy の放射線照射を行い、胸腺の組織学的検査を行った。Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>+/+</sup>マウスでは胸腺皮質の萎縮は見られないが、Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスでは顕著な萎縮が見られた。胸腺皮質の萎縮は p53 遺伝子欠損に依存して起こるが、Chk2 遺伝子の欠損による影響は見られなかった。Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>+/+</sup>マウス、Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスにおいて、胸腺髄質の萎縮が見られたが、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>では萎縮の抑制が見られた。胸腺髄質の萎縮は p53 遺伝子欠損により抑制されるが、Chk2 遺伝子欠損によりその抑制が解除されることが示された。

〔実施例 22〕 放射線照射に対する Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウスの骨髄の組織学的検査

- 20 -

Chk2<sup>-/-</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>-/-</sup>マウス、Chk2<sup>+/+</sup>・p53<sup>+/+</sup>マウスに対し 8Gy の放射線照射を行い、骨髓の組織学的検査を行った。いずれの遺伝子型においても放射線照射による骨髓の萎縮が見られた。

#### 産業上の利用の可能性

本発明において作製された、Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の一方または双方が不活性化された遺伝子改変マウス、該遺伝子改変マウスから樹立された細胞株、あるいは該遺伝子が改変された ES 細胞株を用いることにより、DNA を標的とする抗癌剤の作用・副作用の検出、細胞周期の停止やアポトーシス機序の解析、または DNA 修復機序の解析を効率的に行なうことが可能となった。さらに、細胞周期特異的な薬剤を効率的にスクリーニングすることが可能となった。

- 2 1 -

### 請求の範囲

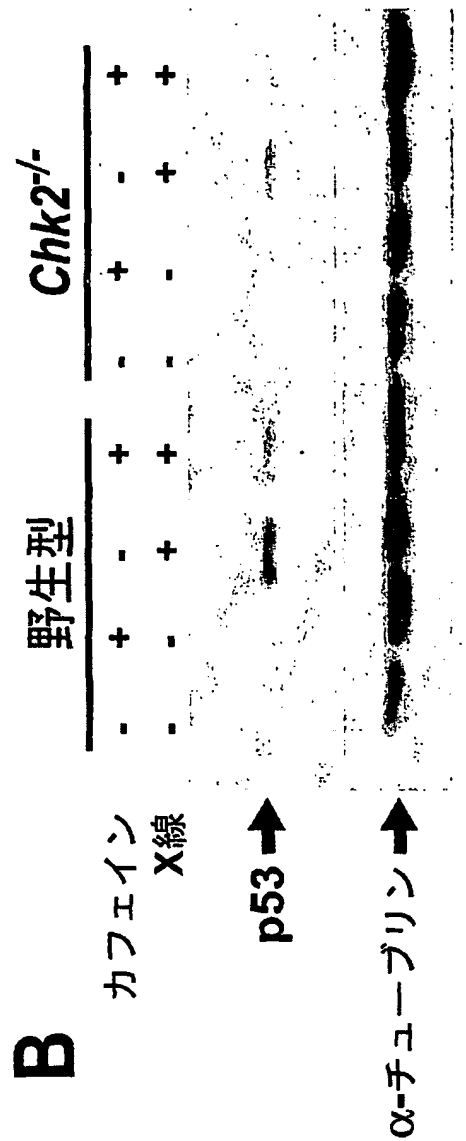
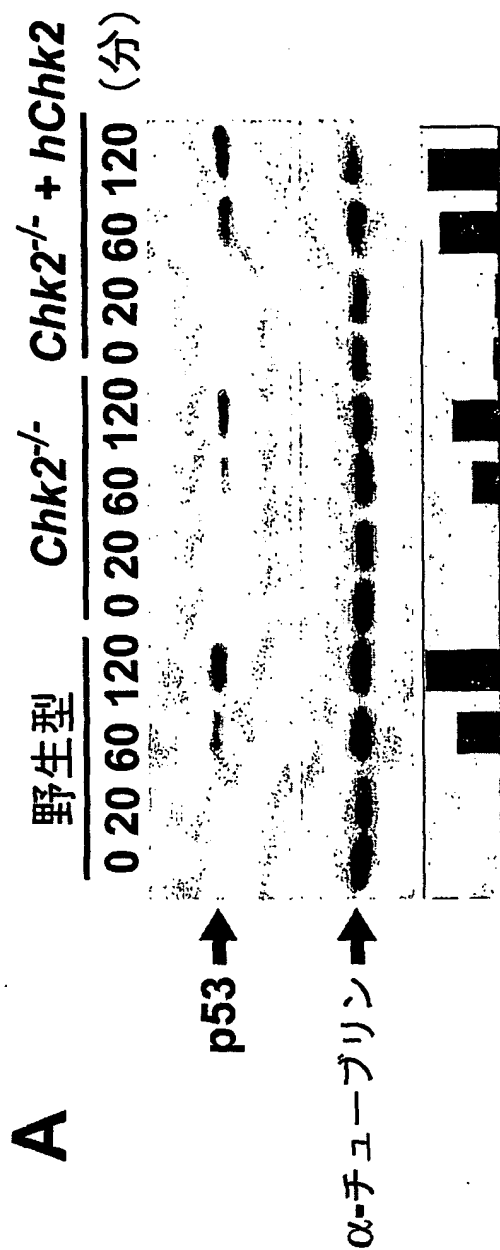
1. マウス Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子が挿入されていることを特徴とするマウス ES 細胞。
2. マウス Cds1(Chk2)遺伝子の遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子が挿入されていることを特徴とする遺伝子改変マウス。
3. 請求項 2 に記載の遺伝子改変マウスから樹立された細胞株。
4. 細胞周期の G1/S 期チェックポイントを特異的に阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (a) DNA 損傷が誘導された請求項 1 または 3 に記載の細胞と被検物質を接触させる工程、
  - (b) 該細胞の増殖活性を測定する工程、および
  - (c) マウス Cds1(Chk2)遺伝子が改変されていない細胞、または DNA 損傷が誘導されたマウス Cds1(Chk2)遺伝子が改変されていない細胞を用いて測定した場合と比較して、工程 (b) において測定される増殖活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。
5. 請求項 4 に記載の方法により単離される、細胞周期の G1/S 期チェックポイントを特異的に阻害する化合物。
6. 細胞周期の G2/M 期チェックポイントを促進する化合物をスクリーニングする方法であって、
  - (a) 請求項 1 または 3 に記載の細胞と被検物質を接触させる工程、
  - (b) 該細胞の G2 期における停止時間を測定する工程、および
  - (c) 被検物質を接触させない細胞を用いて測定した場合と比較して、工程 (b) において測定される停止時間を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

- 22 -

7. 請求項 6 に記載の方法により単離される、細胞周期の G2/M 期チェックポイントを促進する化合物。
8. 被検蛋白質が Cds1(Chk2)の機能を代替する機能を有するか否かの判定または Cds1(Chk2)の機能を代替する機能を有する蛋白質の同定を行なう方法であって、
  - (a) 被検蛋白質をコードする DNA が導入された請求項 1 または 3 に記載の細胞に対し、細胞周期の G1/S 期チェックポイントを阻害する化合物を接触させる工程、
  - (b) 該細胞の G2 期における停止時間を測定する工程、および
  - (c) 被検蛋白質をコードする DNA が導入されない細胞を用いて測定した場合と比較して、工程 (b) において測定される停止時間が増加するか否かを判定する工程、を含む方法。
9. Cds1(Chk2)の機能を代替する機能を有するタンパク質をコードする DNA をスクリーニングする方法であって、
  - (a) DNA ライブラリーが導入された請求項 1 または 3 に記載の細胞に対し、細胞周期の G1/S 期チェックポイントを阻害する化合物を接触させる工程、
  - (b) 該細胞の G2 期における停止時間を測定する工程、および
  - (c) DNA ライブラリーが導入されない細胞を用いて測定した場合と比較して、工程 (b) において測定される停止時間を増加させる蛋白質をコードする DNA を選択する工程、を含む方法。
10. 請求項 9 に記載の方法により単離される Cds1(Chk2)の機能を代替する機能を有するタンパク質をコードする DNA。
11. 請求項 10 に記載の DNA によりコードされる蛋白質。
12. 請求項 5 若しくは 7 に記載の化合物、請求項 10 に記載の DNA、または請求項 11 に記載の蛋白質を含む医薬組成物。
13. 請求項 5 に記載の化合物を有効成分とする抗癌剤。



図 1



2 / 15

図 2

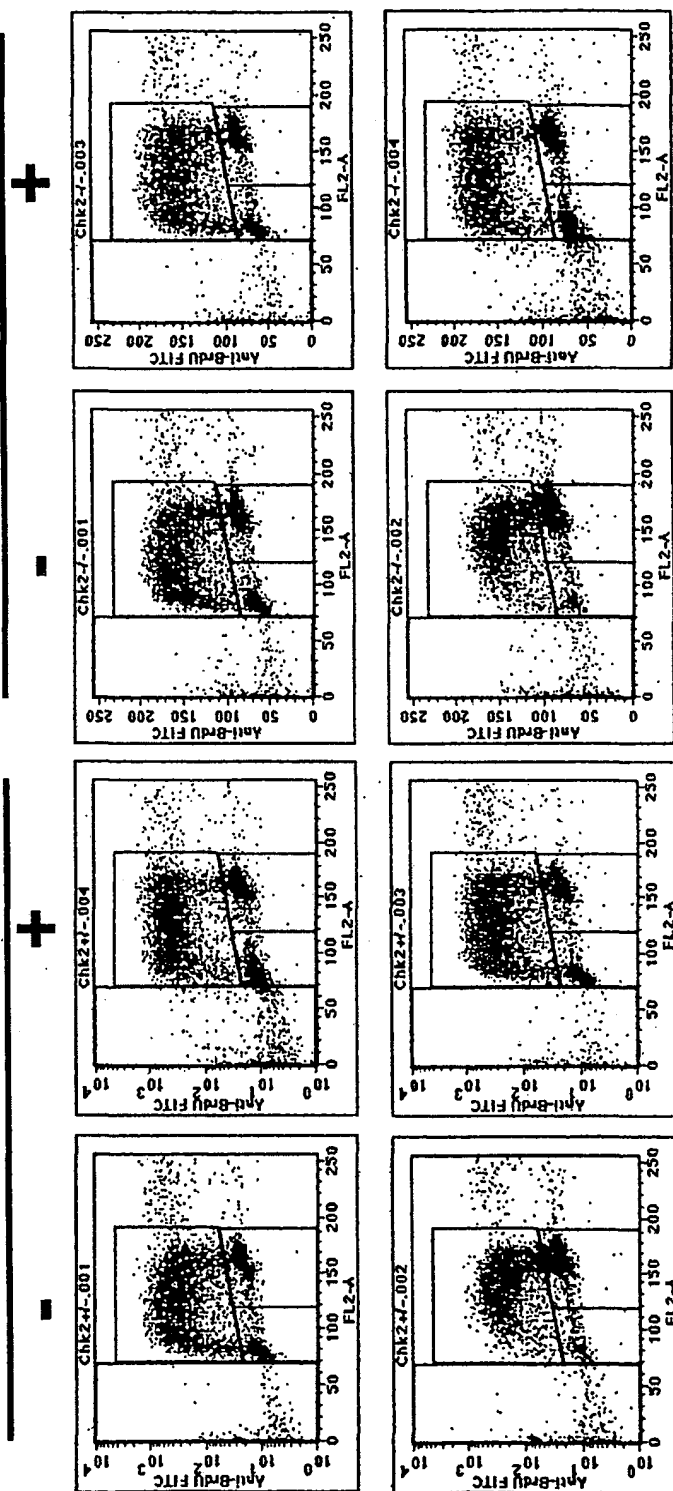
**Chk2<sup>-/-</sup>**  
カフェイン

**Chk2<sup>+/-</sup>**  
カフェイン

X線

0時間

6時間



3 / 15

図 3

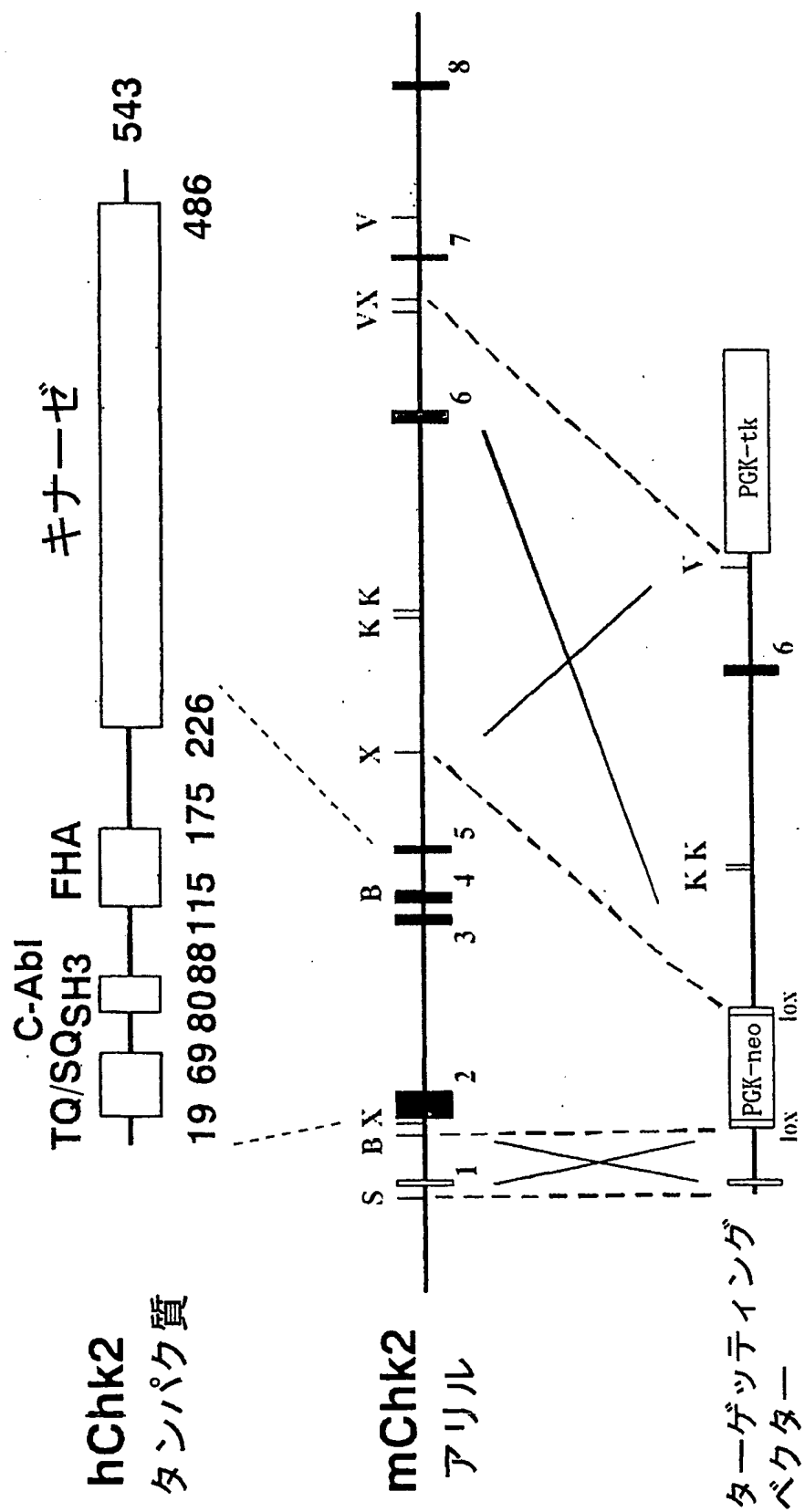


図 4

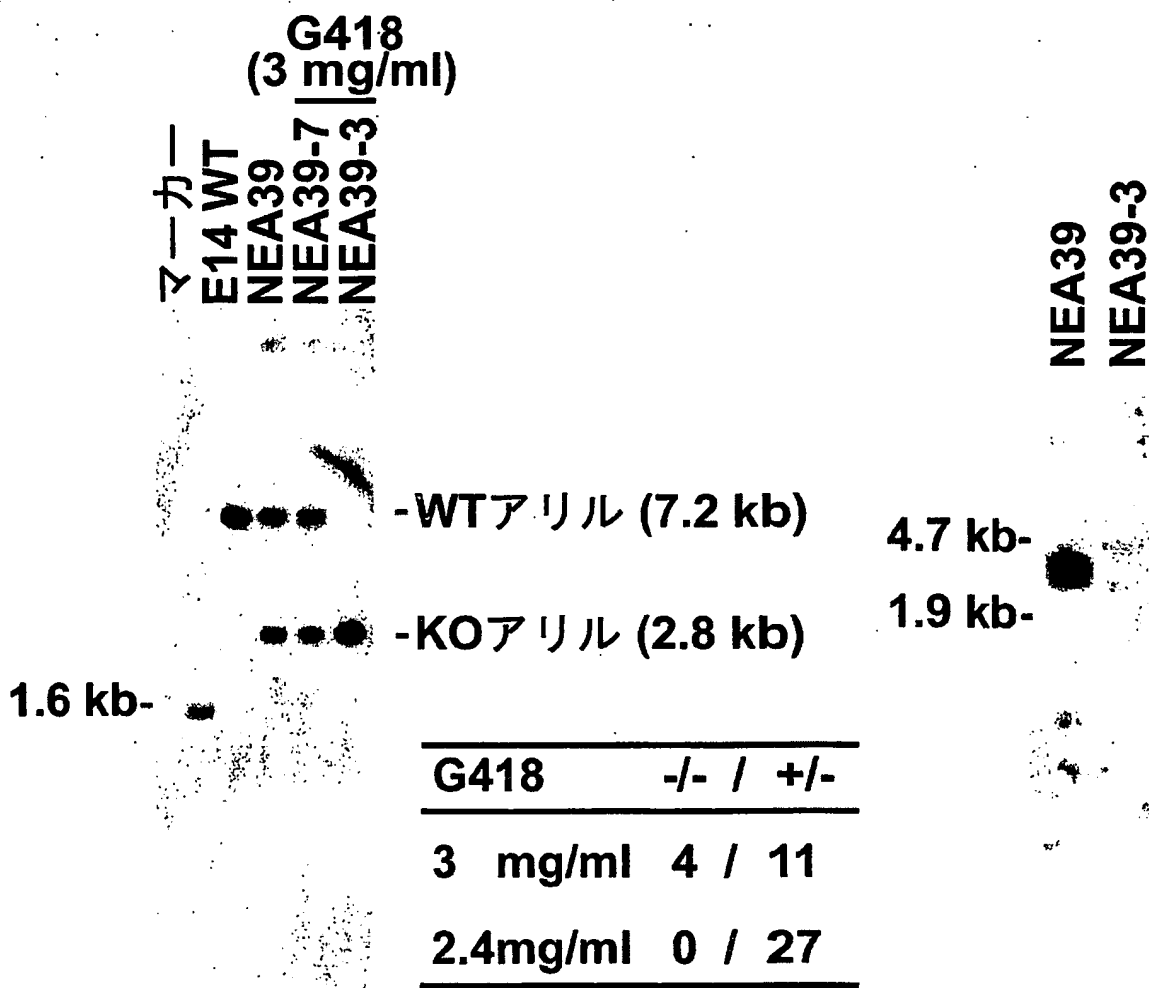
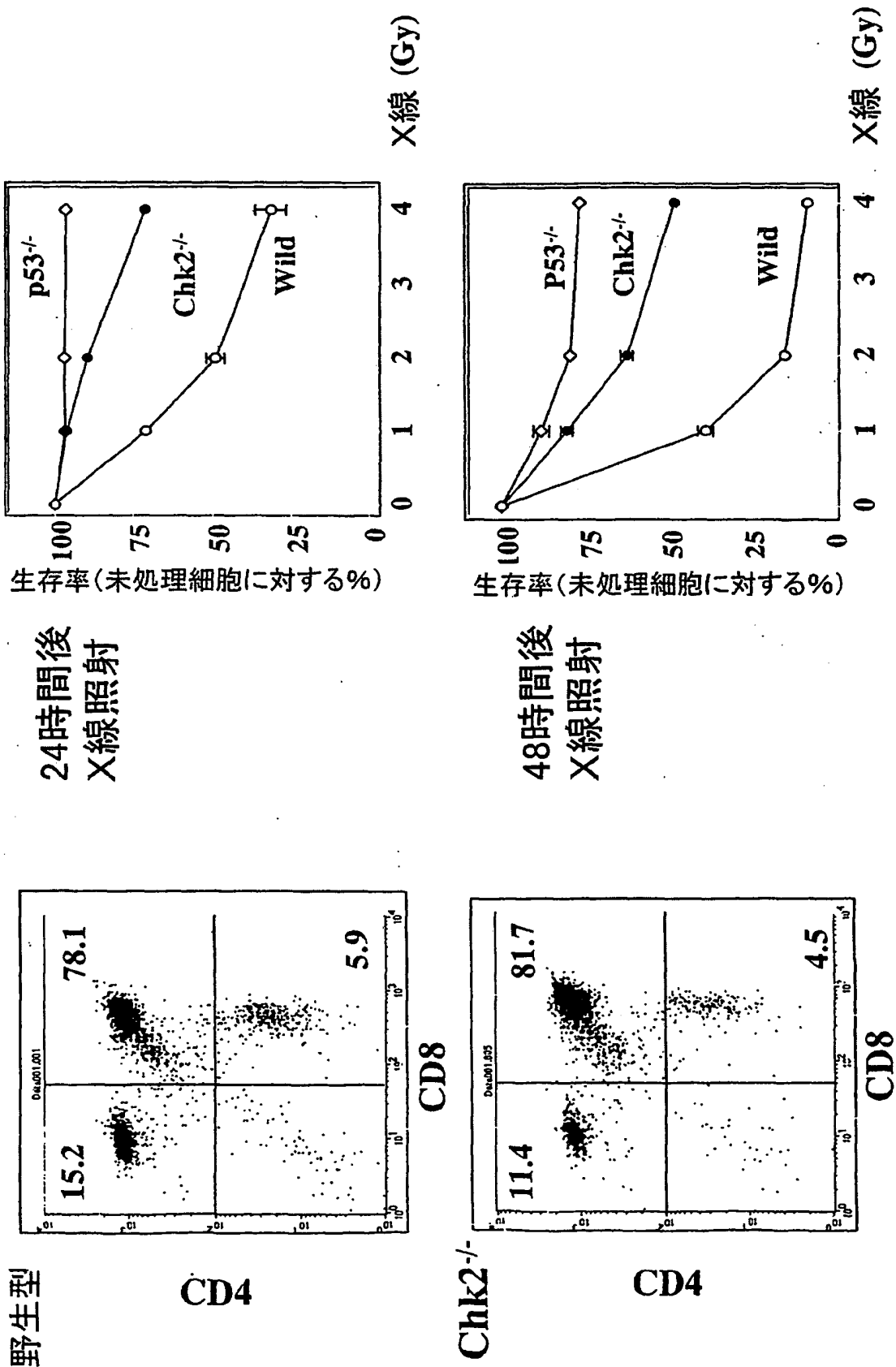
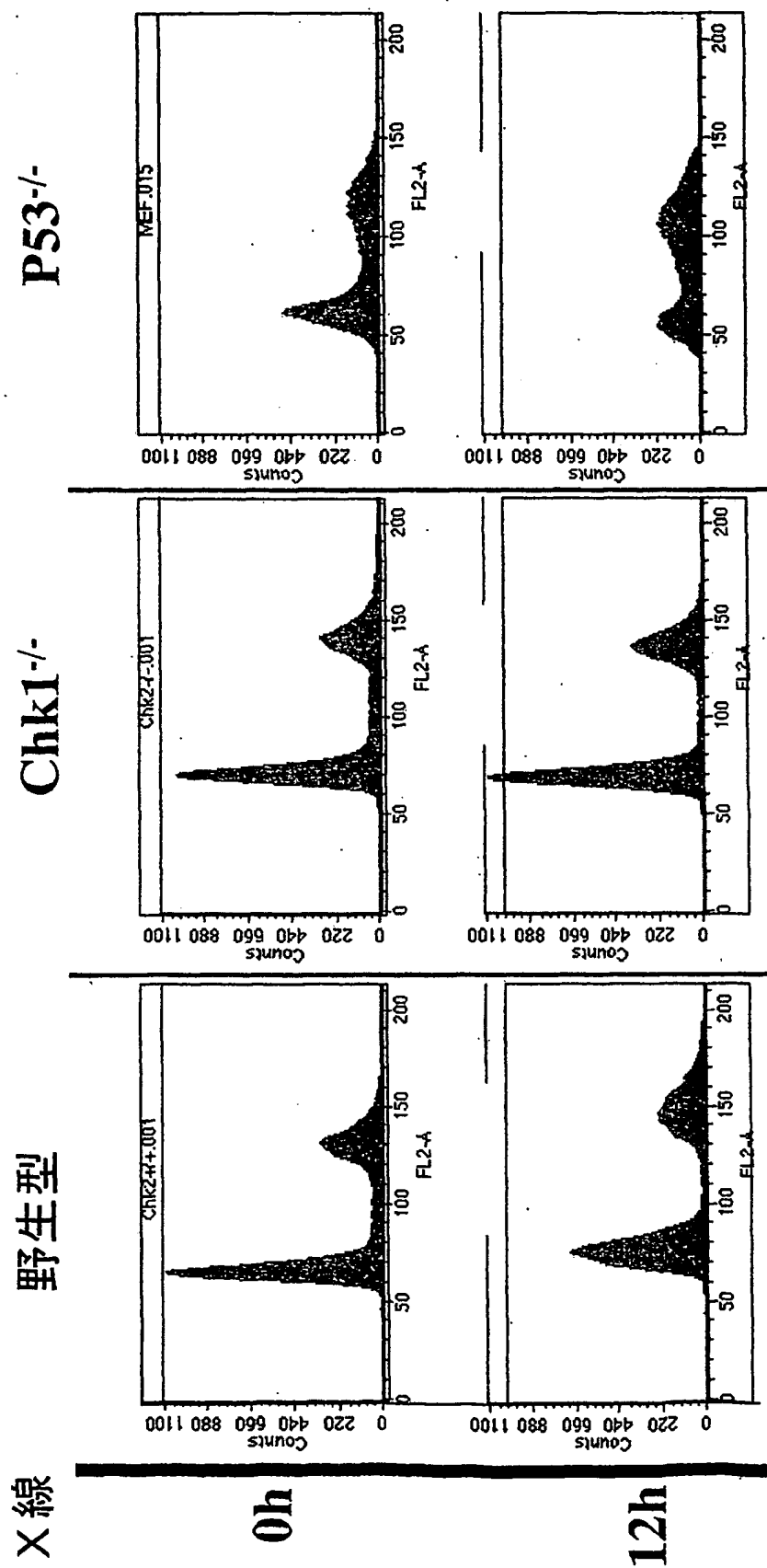


図 5



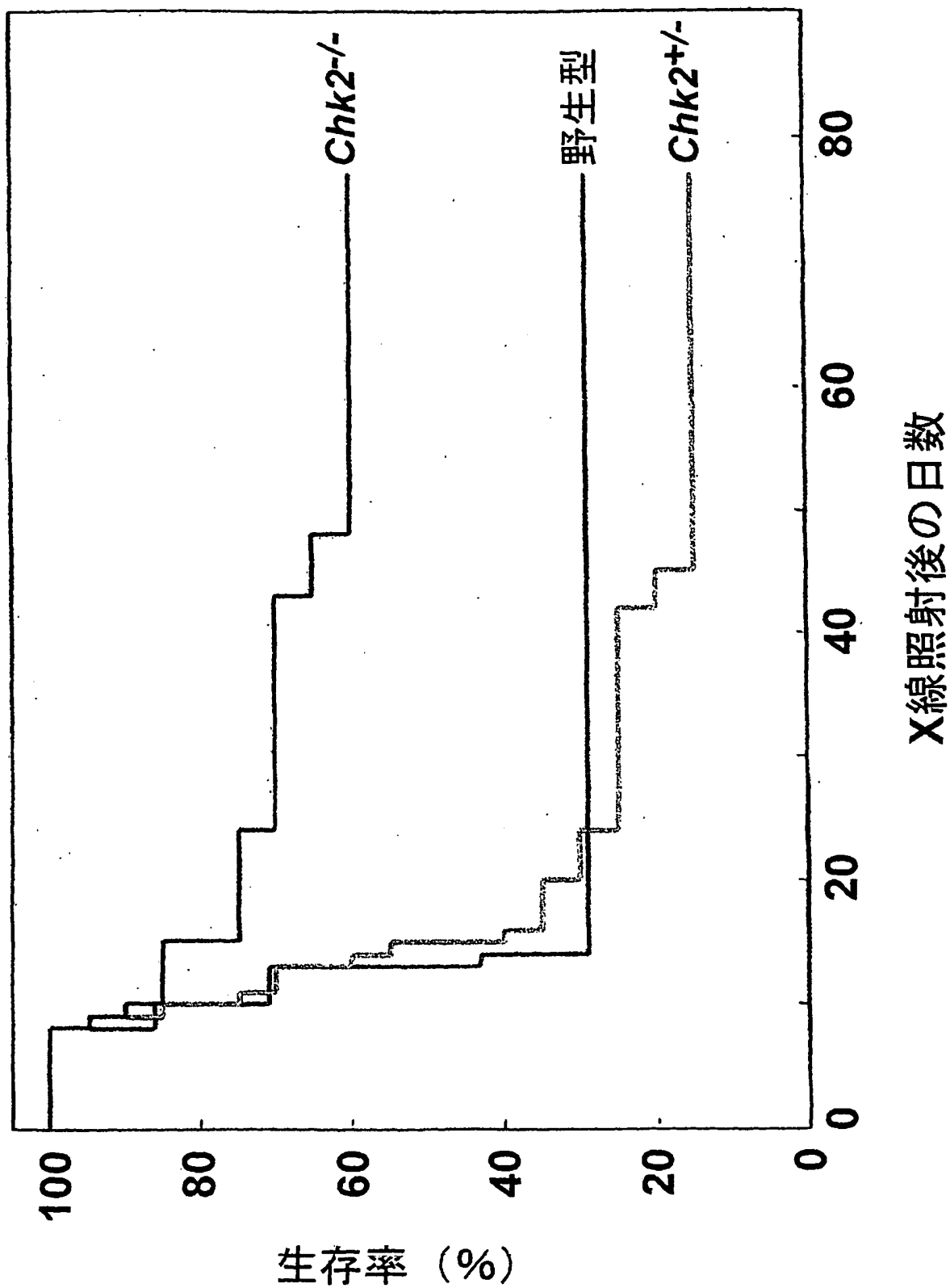
6 / 15

図 6



7/15

図 7



8 / 15

図 8

Chk2-/-



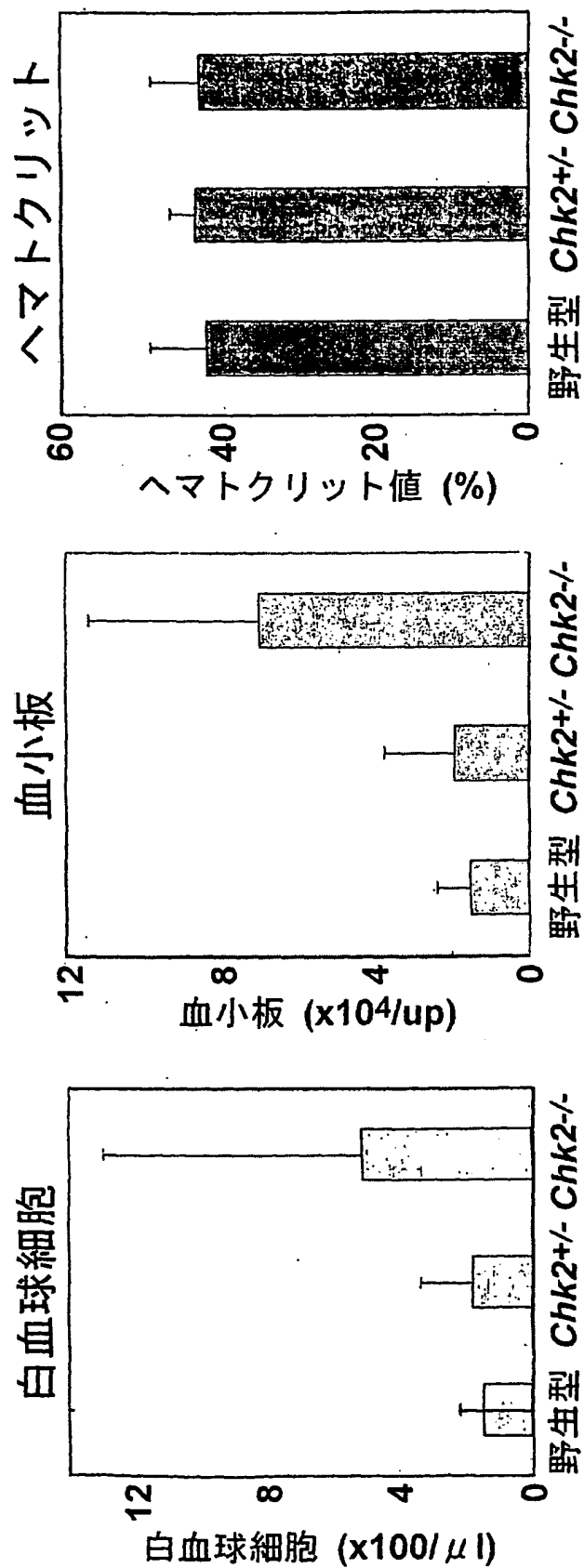
野生型





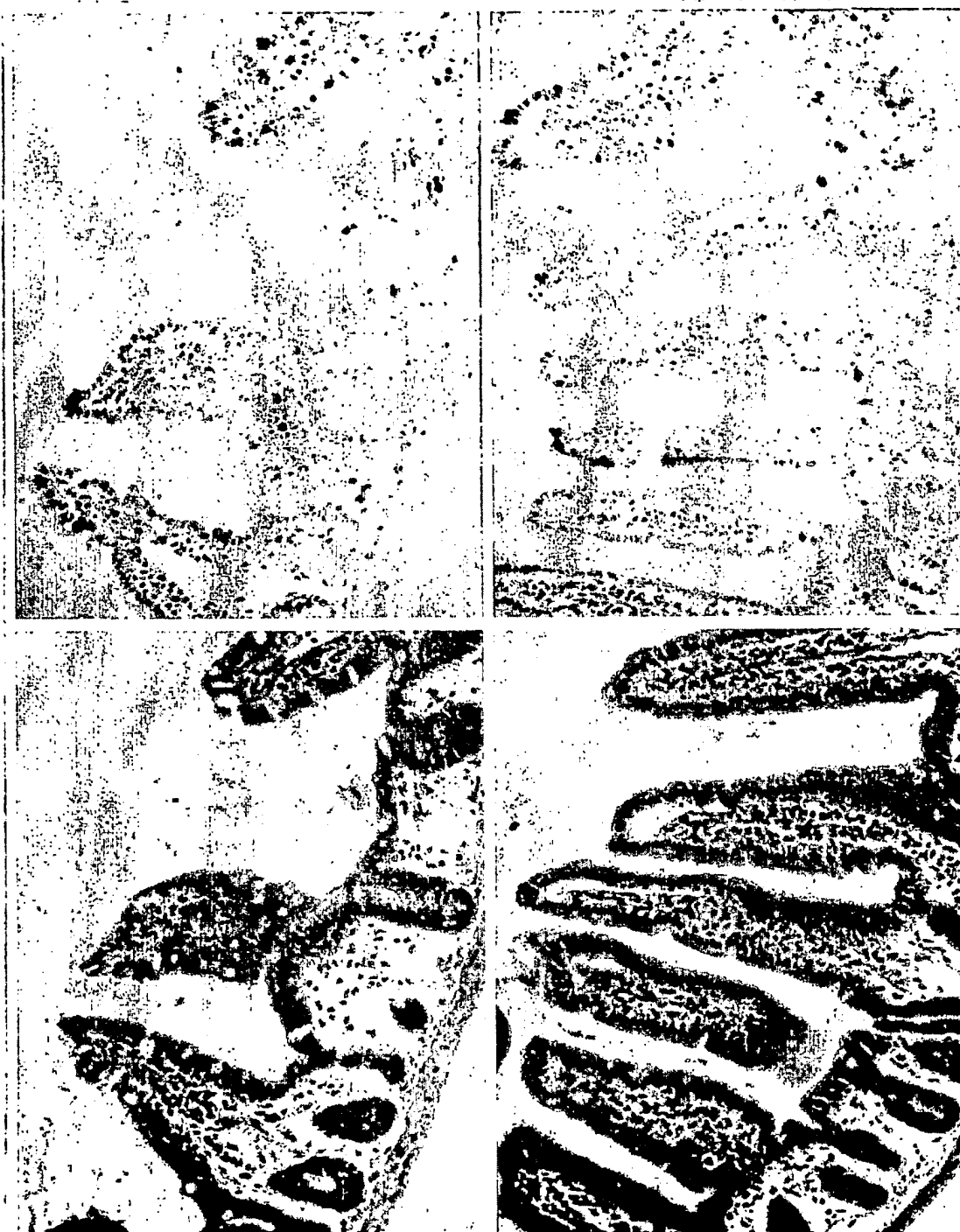
9 / 15

図 9



10/15

図 10

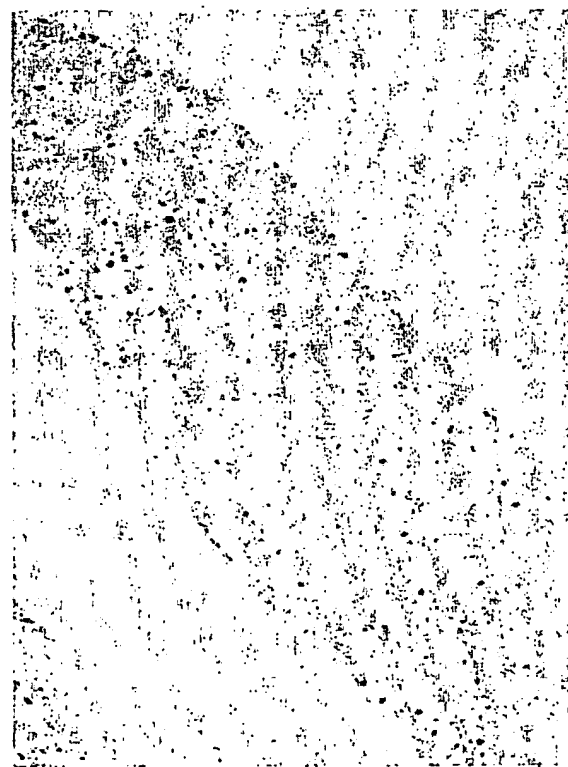
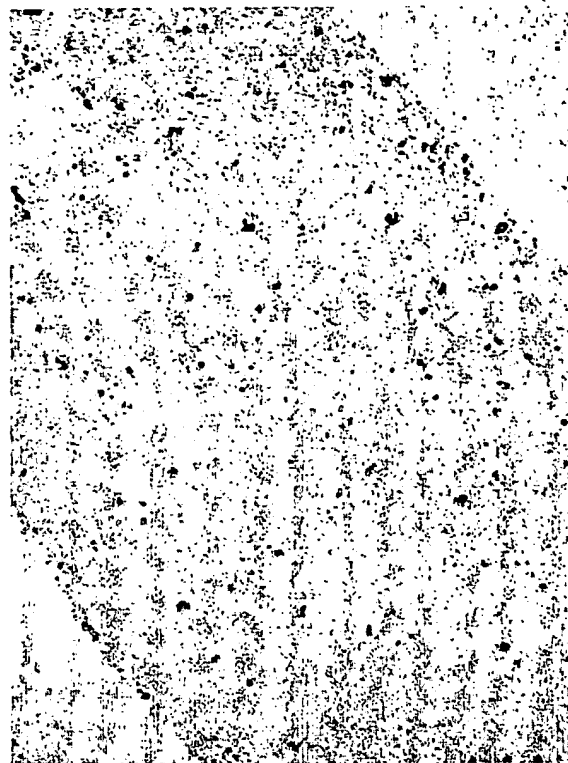
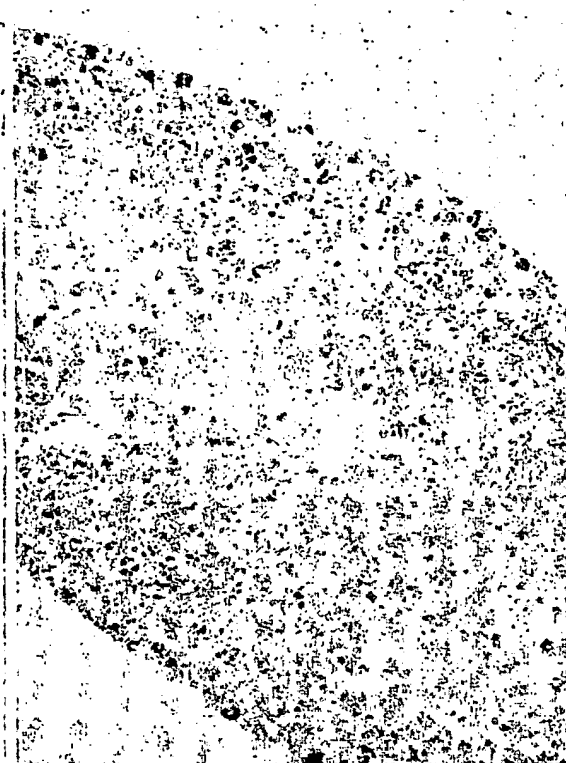


野生型

*Chk2*<sup>-/-</sup>

11/15

図 11

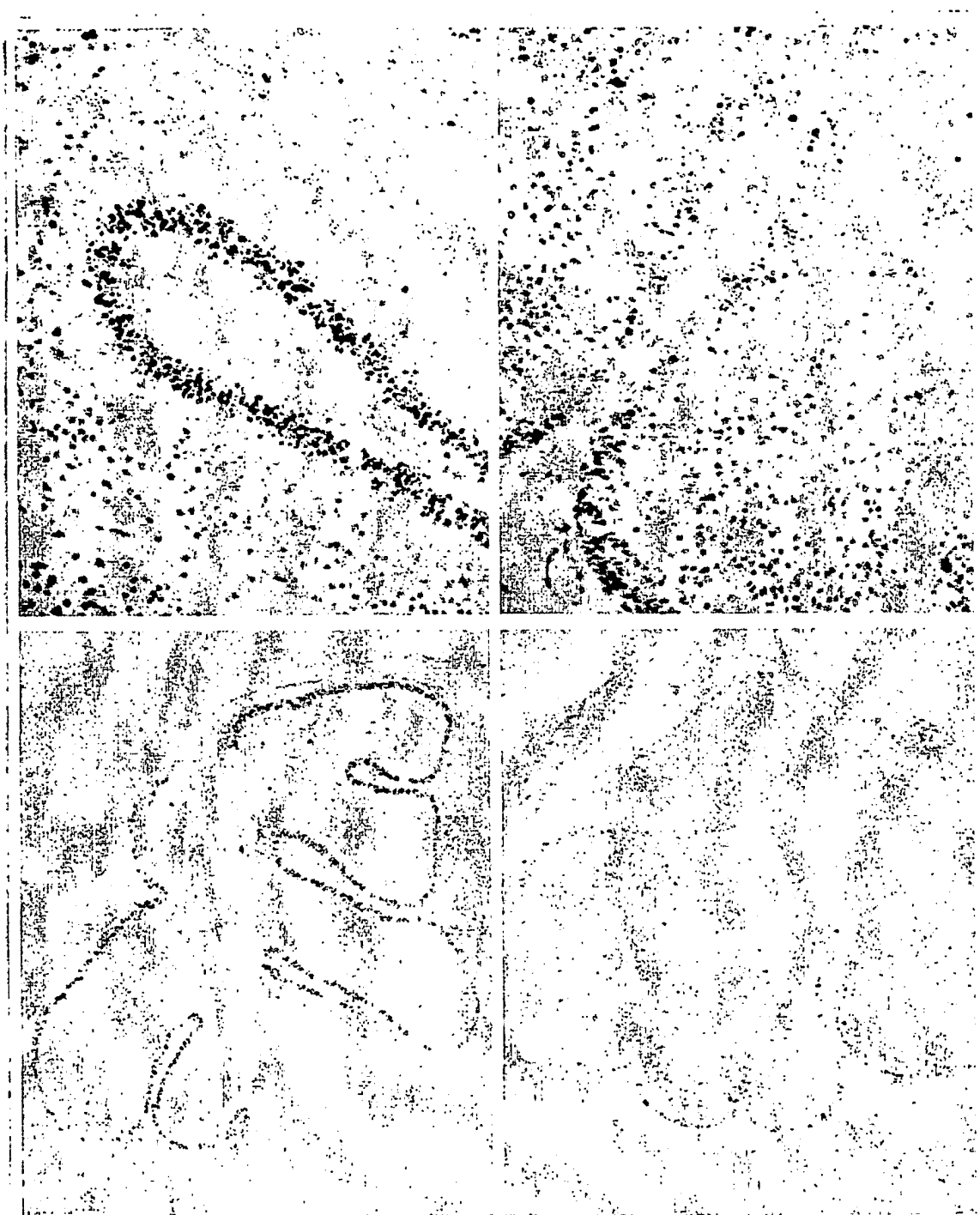


野生型

Chk2<sup>-/-</sup>

12/15

図 12

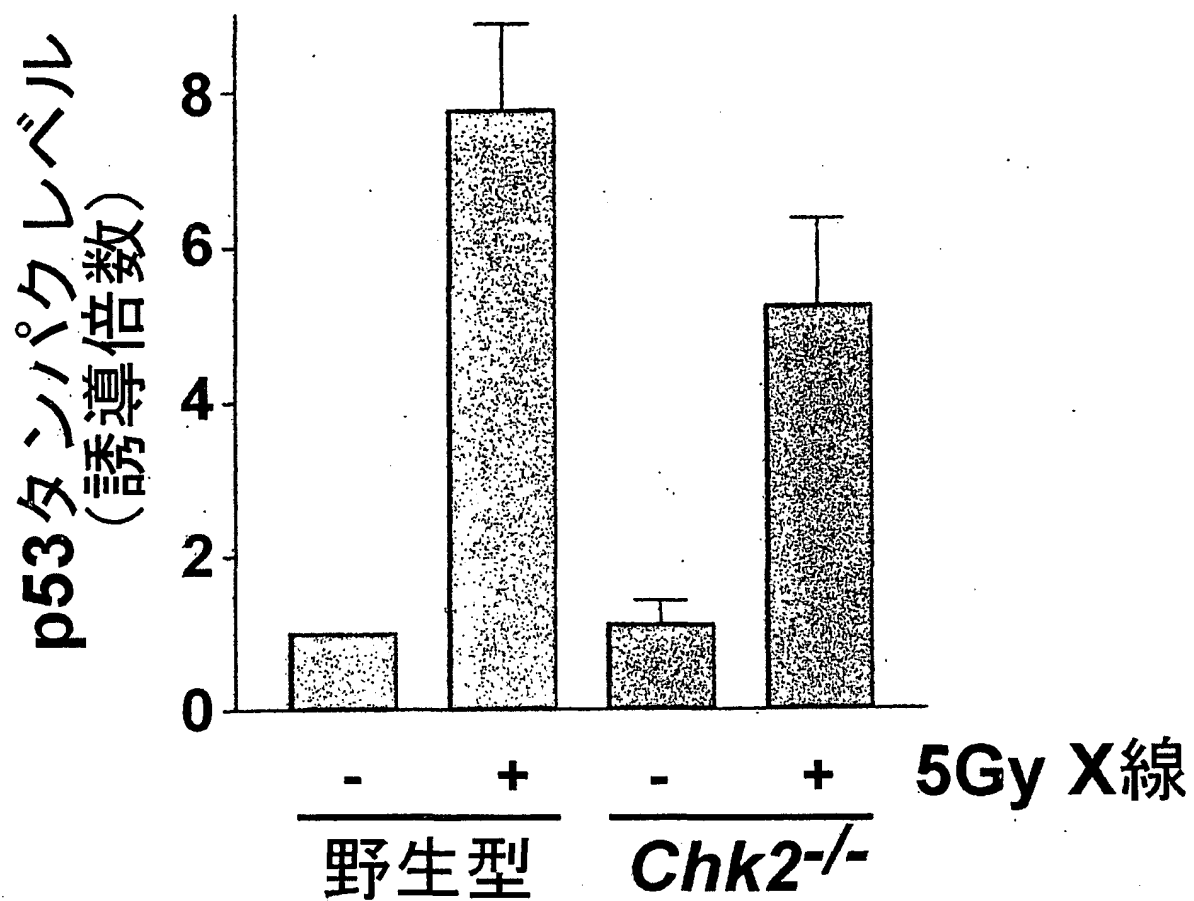


野生型

Chk2<sup>-/-</sup>

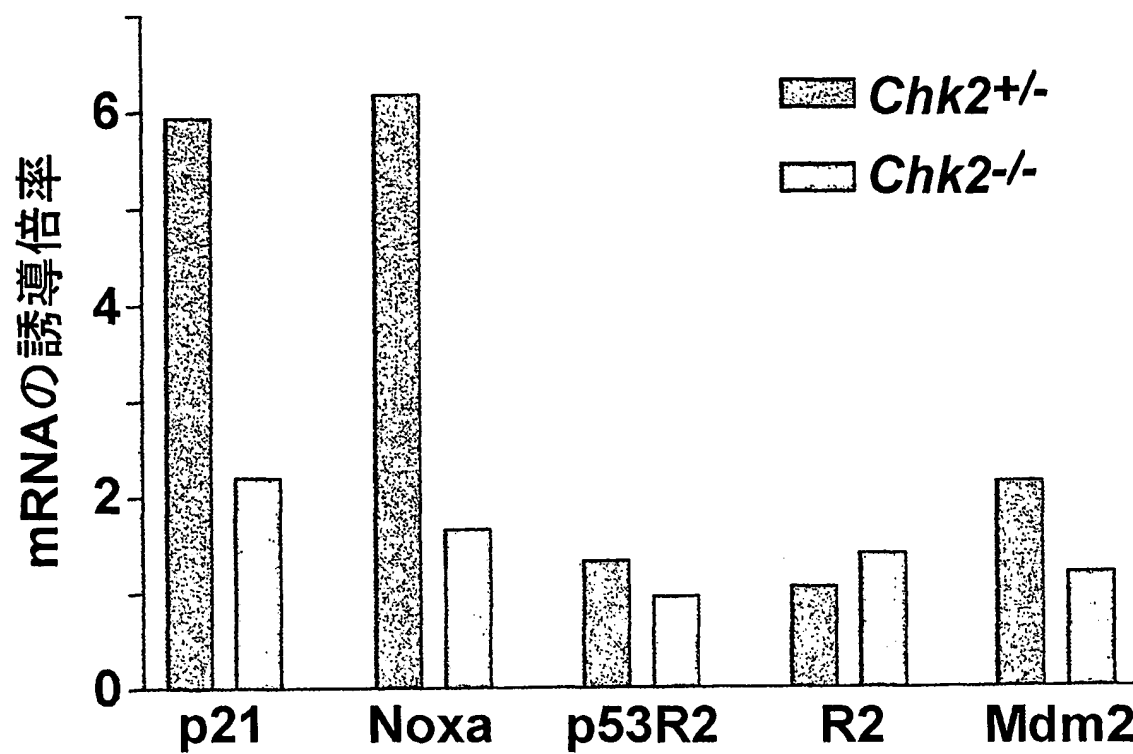
13/15

図 13



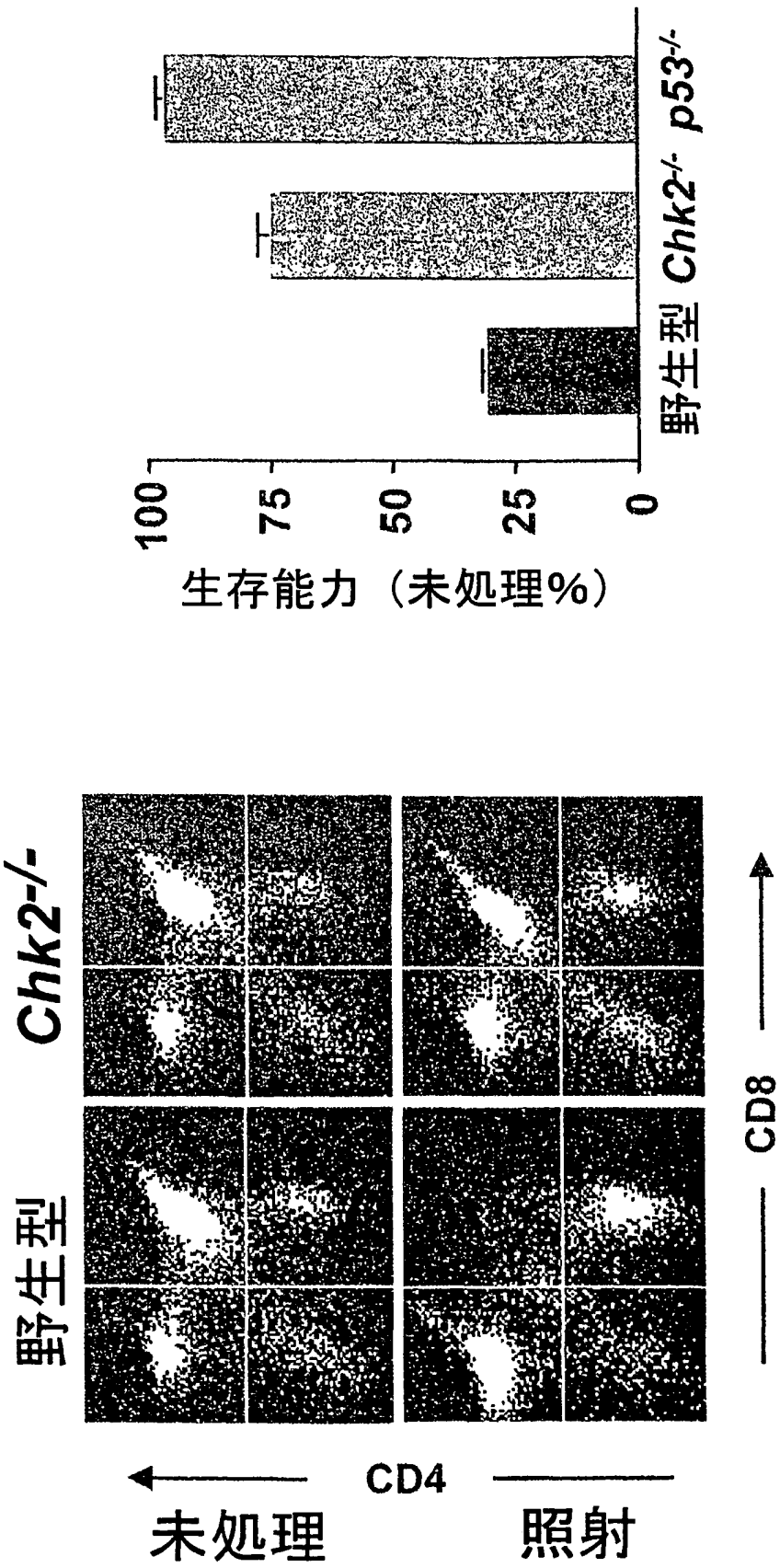
14/15

図 14



15 / 15

図 15



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05314

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N5/10, C12N15/12, A01K67/027, A61K31/711, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/47, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N5/10, C12N15/12, A01K67/027, A61K31/711, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/47, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST FILE (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIRAO A. et al., "DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2", Science, March, 2000, Vol.287, pages 1824 to 1827	1-3
A	DASIKA G. K. et al., "DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand leak repair in development and tumorigenesis", Oncogene, (1999), Vol.18, pages 7883 to 7899	1-4, 6, 8, 9
A	TOMINAGA K. et al., "Role of Human Cds1 (Chk2) Kinase in DNA Damage Checkpoint and Its Regulation by p53", The Journal of Biological Chemistry, (1999), Vol.274, No.44, pages 31463 to 31467	1-4, 6, 8, 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 August, 2001 (28.08.01)

Date of mailing of the international search report  
11 September, 2001 (11.09.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05314

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 5,7,10-13  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  

The "compound" as set forth in claim 5 involves any compounds obtained by the screening method described in claim 4. However, the description discloses no particular compound obtained by this method. Namely, the compound is not fully supported by the description. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what particular compounds are involved in the scope thereof. Thus, claim 5 is described in an extremely unclear manner. Therefore, no meaningful search can be practiced on this claim. The same applies to claims 7 and 10 to 13 too.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N5/10, C12N15/12, A01K67/027, A61K31/711, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/47, G01N33/15, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N5/10, C12N15/12, A01K67/027, A61K31/711, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/47, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	HIRAO A. et al. DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. SCIENCE March 2000, Vol. 287, p. 1824-1827.	1-3
A	DASIKA GK. et al. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. Oncogene 1999, Vol. 18, p. 7883-7899	1-4, 6, 8, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.08.01

国際調査報告の発送日

11.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TOMINAGA K. et al. Role of Human Cdsl(Chk2)Kinase in DNA Damage Checkpoint and Its Regulation by p53. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1999, Vol. 274, No. 44, p. 31463-31467	1-4, 6, 8, 9

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 5, 7, 10-13 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲5に記載の「化合物」は、請求の範囲4に記載されたスクリーニング方法で得られるあらゆる化合物を包含するものである。しかし、明細書には、当該方法で得られる化合物として具体的なものが記載されておらず、明細書による十分な裏付けを欠いており、出願時の技術常識を参酌しても、具体的にはどのようなものが包含されるのかが全く不明である。よって、請求の範囲5の記載は著しく不明確であり、有意義な国際調査をすることができない。請求の範囲7及び10-13についても同様である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**